

⑤ 製造工程の病原体に対する安全性について

セルバンクに対する試験の他に、製造工程で使用する原材料については、原材料供給業者の試験成績の確認と受け入れ試験が行われ、病原体に関する安全性の確保措置が執られている。

未加工/未精製バルク■ロットにおいて、ウイルス試験(*in vitro* 試験)が実施されており、ウイルス混入を示す結果は得られていない。

精製工程においてウイルスが不活化又は除去されることを検証するために、表 2-1 に示す 5 種類のウイルスを用いてクリアランス試験が実施された。

表 2-1 ウイルスクリアランスの評価に用いたモデルウイルスと測定方法

モデルウイルス	異種指向性マウス白血病ウイルス (X-MuLV)	ウシ下痢性ウイルス (BVDV)	仮性狂犬病ウイルス (PRV)	レオウイルス 3 型 (REO-3)	マウス微小ウイルス (MMV)
脂質膜	あり			なし	
ゲノム	RNA		DNA	RNA	DNA
サイズ (nm)	70~100	40~70	120~200	60~80	18~25
測定方法	フォーカス形成法			細胞変性効果観察法	

精製工程のうち、イムノアフィニティークロマトグラフィー工程、陽イオン交換クロマトグラフィー工程、有機溶剤/界面活性剤処理工程及び陰イオン交換クロマトグラフィー工程の 4 工程が、原理の異なるウイルス不活化又は除去工程として評価された。

ウイルスクリアランス試験の結果は、表 2-2 の通りであった。

表 2-2 ウイルスクリアランスの工程評価一覧

工 程	(log ₁₀) モデルウイルス				
	異種指向性マウス白血病ウイルス (X-MuLV)	ウシ下痢性ウイルス (BVDV)	仮性狂犬病ウイルス (PRV)	レオウイルス 3 型 (REO-3)	マウス微小ウイルス (MMV)
イムノアフィニティークロマトグラフィー					
陽イオン交換クロマトグラフィー					
有機溶剤/界面活性剤処理工程					
陰イオン交換クロマトグラフィー					
総クリアランス指数	13.7 以上	7.0 以上	6.8 以上	6.8 以上	3.7

() は 1 に満たないため、総クリアランス指数の計算に換算されていない。

(2) アドベイト原薬

本薬の構造及び特性は、アミノ酸配列が同一であるリコネイト原薬と併せて、物理的・化学的性質、免疫化学的性質、生物学的性質等の検討を行うことにより確認されている。即ち、ペプチドマップ(トロンビン処理試料、トロンビン処理試料のフラグメントピークをそれぞれトリプシン処理した試料)、チロシンの硫酸化、糖鎖構造解析、糖組成分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、サイズ排除液体クロマトグラフィー、円偏光二色性スペクトル分析、イムノブロット試験、抗FVIIIモノクローナル抗体に対する親和性、活性化第X因子生成速度、ブタ活性化第IX因子との相互作用(結合定数)の検討がなされている。これらの比較の結果、SDS-PAGE やサイズ排除液体クロマトグラフィーにおいて、バンドの泳動度や濃さに多少の差を認めることを除いて、本薬とリコネイト原薬は類似していることが示されている。

また、目的物質由来不純物(凝集体量)、製造工程由来不純物(CHO 細胞由来たん白質、vWF 含量試験(ELISA 法)、マウス IgG 含量(ELISA 法)及び CHO 細胞由来 DNA 含量)の測定が行われている。

原薬の規格及び試験方法として、性状、確認試験(イムノブロット試験)、オリゴ糖、ペプチドマップ、pH、純度試験(CHO 細胞由来たん白質含量、vWF 含量試験、マウス IgG 含量、CHO 細胞由来 DNA 含量)、エンドトキシン試験、微生物限度試験(生菌数試験)、比活性、力価(参考値)が設定されている。なお、CHO 細胞由来 DNA 含量については、申請時は規格及び試験方法に設定されていなかったが、審査の過程において追加されたものである。

本薬の安定性については、①長期保存試験(−80℃/テフロン製容器/36 か月)、②加速試験(−40℃/テフロン製容器/36 か月)が実施された。オリゴ糖、純度試験(CHO 細胞由来たん白質含量、vWF 含量、マウス IgG 含量)、エンドトキシン試験及び微生物限度試験(生菌数試験)については、保存による影響を受けにくいと判断されて測定されなかった。長期保存試験の結果、いずれの測定項目についても規格(リコネイトを踏まえ暫定的に設定されたもの)の範囲内であり、36 か月安定であった。また、加速試験では比活性が経時的に低下したが、3 か月まで規格の範囲内であった。力価(参考値)については、ロット間のばらつきや測定毎のばらつきが大きいこともあり長期保存試験では明らかな経時的な低下を認めなかったが、加速試験では経時的に低下した。

以上より、申請者は、原薬の有効期間を、気密容器に入れて−80℃で保存するとき 24 か月とした。

(3) アドベイト製剤

製剤設計として、既承認薬のリコネイトにおいて添加剤(安定剤)として使用されているヒト血清アルブミンを使用しないことを目的として、本剤の開発が行われた。安定性試験等の検討に基づいて処方が決められ、 剤及び 剤としてトレハロース及びD-マンニトール、 剤としてグルタチオン、 剤としてL-ヒスチジン及びトロメタモール、その他に、塩化カルシウム、塩化ナトリウム及びポリソルベート80が使用されている。製剤処方については開発段階で何回かの変更が行われているが、申請処方にて臨床試験が実施されており、品質試験製剤と臨床試験製剤との同等性については問題はない。

製剤の規格及び試験方法として、性状、確認試験(SDS-PAGE)、pH、浸透圧比、純度試験(凝集体量(サイズ排除液体クロマトグラフィー))、水分、再調製時間、エンドトキシン試験、質量偏差試験、注射剤の不溶性異物検査、注射剤の不溶性微粒子試験、無菌試験、比活性、力価試験が設定され、各容れ目製剤について実生産スケールで製造された3ロットの成績が示されている。

本剤の容器及び施栓系の妥当性を示すために、後述の安定性試験の他に、針刺し後のゴム栓からの微粒子の混入及びゴム栓を通しての微生物の混入を否定する試験が行われ、これらの混入は認められなかった。また、臨床現場において使用される容器への適合性を検討する目的で、本剤を溶解液、生理食塩液等に溶解後、シリンジやチューブ等に接した状態で一定時間保存した後の検体について力価又は回収率を測定したところ、吸着の影響は認められなかった。

本剤の安定性については、パイロットスケール(一部、実生産スケール)で製造された製剤(250単位、500単位、1,000単位)を用いて評価がなされた。①長期保存試験($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ /暗所/密封無色ガラスバイアル/30か月)、②加速試験($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ /暗所/密封無色ガラスバイアル/30か月及び $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ /暗所/密封無色ガラスバイアル/30か月)及び③苛酷試験($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ /75%RH $\pm$ 5%RH/暗所/密封無色ガラスバイアル/6か月、 $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ /暗所/密封無色ガラスバイアル/6か月)が実施され、性状、確認試験(SDS-PAGE)、pH、純度試験(凝集体量)、水分、再調製時間、注射剤の不溶性異物検査、無菌試験、比活性及び定量(力価)について測定がなされた。また、有効成分の含量が低く、安定性に最も影響を受けやすいと考えられる250単位製剤1ロットを用いて、④光に対する苛酷試験(密封無色ガラスバイアル/キセノンランプで120万~180万Lux $\cdot$ hr及び765W/h/m²)が実施された。⑤溶解後の安定性を評価するために、長期保存試験における開始時及び24か月保存後の検体

を用いて、室温にて溶解後 24 時間までの性状、確認試験(SDS-PAGE)、pH、純度試験(凝集体量)、比活性及び力価の測定がなされた。

試験結果は、以下の通りであった。

- ① 長期保存試験($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$)では、力価及び比活性に経時的な減少が認められ、力価については、試験開始時の対表示量が低いロットで規格(表示量に対して 80~120%)の逸脱が認められた。比活性については、経時的な減少が認められたものの規格の範囲内であった。水分、凝集体量については、規格の範囲内で高値が認められることがあったが、一定の傾向はなかった。それ以外の項目について、保存期間における変化は認められなかった。
- ② 加速試験($25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 又は $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$)では、力価及び比活性の低下が認められた。力価については、250 単位製剤で 12 か月後には複数ロットで規格(表示量に対して 80~120%)を逸脱した他、500 単位製剤、1,000 単位製剤でも保存後期に規格を逸脱するロットが認められた。水分、凝集体量については、規格の範囲内で高値が認められることがあったが、一定の傾向はなかった。それ以外の項目について、保存期間における変化は認められなかった。
- ③ 苛酷試験では、力価及び比活性の低下、凝集体量及び水分の増加が認められた。力価及び比活性については、規格から逸脱するロットが複数出現した。凝集体量については、 $50^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ で保存した場合に 1 ロットで規格からの逸脱を認めたが、その他は規格の範囲内であった。水分は増加を認めたが、規格の範囲内であった。それ以外の項目では、保存期間における変化は認められなかった。
- ④ 光に対する苛酷試験として 250 単位製剤 1 ロットにつき試験した結果、いずれの項目においても対照試料(アルミ箔遮光)と比較して違いは認められなかった。
- ⑤ 溶解後の安定性については、250 単位製剤で溶解から 24 時間後に力価の低下を認めた以外は、いずれの測定項目においても溶解直後と比べて著しい変化は認められなかった。

以上の試験成績を踏まえ、製剤の貯法及び有効期間は、 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存するとき 24 か月とされた。また、溶解後、24 時間は安定であるとされた。

なお、審査の過程において、実生産スケールで製造された各製剤の長期保存試験($\blacksquare^{\circ}\text{C}\pm \blacksquare^{\circ}\text{C}$ 、24 か月)の成績が追加提出された。製剤の規格及び試験方法の全試験項目に加え、発熱性物質試験及び異常毒性否定試験について測定がなされ、いずれも規格の範囲内であった。同製剤を用いた加速試験($25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $60\%\text{RH}\pm 5\%\text{RH}$ 、6 か月)も実施されており、同一の試験項目について測定がなされ、いずれも規格の範囲内であった。これら長期保

存試験及び加速試験の成績は、上述のパイロットスケールでの試験成績と比べ特段の違いを認めなかった。

(4) 標準物質

標準物質(自家一次標準物質、自家用標準物質)は、本薬の製造方法を準用して調製される。また、本薬の規格を準用して標準物質の規格が定められており、それらに適合することを確認した後、小分けされ、 -80°C で保存される。標準物質は■年間の有効性が担保されており、それ以後試験を■年毎に行う予定とされている。なお、自家一次標準物質については申請時には設定されていなかったが、審査の過程において自家用標準物質の一定性を担保するために規定されたものである。

また、本剤の力価測定用標準品には、国際標準品又は米国の乾燥濃縮血液凝固第Ⅷ因子製剤標準品(FDA 公認の市販品：血液凝固第Ⅷ因子の規定量を含む乾燥製剤であり、1管中表示された国際単位を含む)が用いられている。

2) 機構における審査の概略

(1) アドベイト原薬の規格について

本薬の申請時の規格及び試験方法とリコネイトのそれを比較したところ、表 2-3 に示すような相違があった(審査上、問題とされた試験項目についてのみ記載)。

表 2-3 本薬(申請時)とリコネイト原薬の規格及び試験方法の相違点

試験項目		本薬(アドベイト原薬)	リコネイト原薬	理由
工程由来不純物	CHO 細胞由来たん白質含量	規格値：■ $\mu\text{g}/1,000$ 単位以下	規格値：■ $\mu\text{g}/1,000$ 単位以下	実測値に基づく見直し
	vWF 含量	規格値：■ $\mu\text{g}/1,000$ 単位以下	規格値：■ $\mu\text{g}/1,000$ 単位以下	実測値に基づく見直し
	CHO 細胞由来 DNA 含量	■	規格値：■ $\text{pg}/1,000$ 単位以下	バリデーション結果からリコネイトの規格値以下に恒常的に管理可能であると判断
	マウス IgG 含量	規格値：■ $\text{ng}/1,000$ 単位以下	規格値：■ $\text{ng}/100\mu\text{g}$ たん白質以下	実測値に基づく見直し
糖鎖		■	■	(試験方法の変更)
ペプチドマップ		規格値：■	規格値：■	実測値に基づく見直し
部分アミノ酸配列		■	■	特性解析において確認しており、規格設定の必要がないと判断